

## (12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional(43) Fecha de publicación internacional  
21 de Noviembre de 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 02/092633 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes: C07K 16/16

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00208

(22) Fecha de presentación internacional:  
3 de Mayo de 2002 (03.05.2002)

(25) Idioma de presentación: español

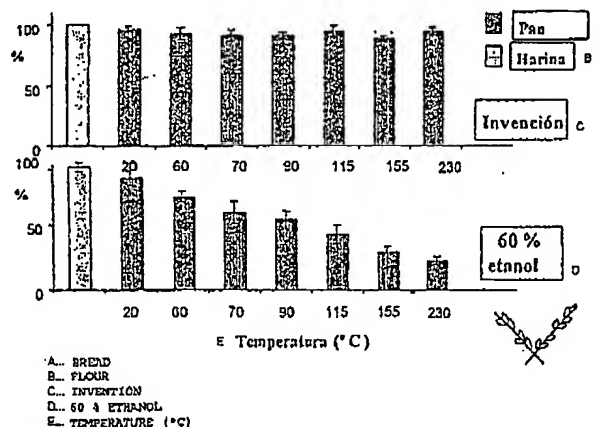
(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 200101098 14 de Mayo de 2001 (14.05.2001) ES(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006  
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): LÓPEZ  
VILLAR, Elena [ES/ES]; Centro Nacional de Biotec-  
nología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,  
CSIC. Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).  
LLORENTE GÓMEZ, Mercedes [ES/ES]; Centro  
Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Inves-  
tigaciones Científicas, CSIC. Campus de Cantoblanco,  
E-28049 Madrid (ES). MÉNDEZ CORMÁN, Enrique  
[ES/ES]; Centro Nacional de Biotecnología, Consejo  
Superior de Investigaciones Científicas, CSIC. Campus de  
Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).(74) Mandatario: REPRESA SÁNCHEZ, Domingo; Con-  
sejo Superior de Investigaciones Científicas, Oficina de  
Transferencia de Tecnología, C/Serrano, 113 - 2ª planta,  
E-28006 Madrid (ES).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR EXTRACTING GLUTEN CONTAINED IN HEAT-PROCESSED AND NON-HEAT-PROCESSED  
FOODSTUFFS, COMPATIBLE WITH AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, COMPOSITION AND KITS  
COMPRISING SAID COMPOSITION(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS, PROCESADOS Y NO PROCESA-  
DOS POR CALOR, COMPATIBLE CON ELISA, COMPOSICIÓN Y KITS QUE COMPRENDEN DICHA COMPOSICIÓN

(57) Abstract: The invention relates to a method for extracting the gluten contained in a sample consisting in using an ethanol aqueous solution in the presence of a composition containing a disulphur group reducer and a decoupling agent, in a buffer having a pH of between 7 and 8. The inventive method can be used to extract quantitatively the gluten contained in a heat-processed or non-heat-processed food sample before the quantification of the gluten by ELISA. Said method is suitable for food analyses, in particular, for foodstuffs intended for coeliac sufferers.

[Continúa en la página siguiente]

WO 02/092633 A1

2/28

## WO 02/092633 A1



(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) Resumen: El procedimiento comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra con una solución acuosa de etanol en presencia de una composición que comprende un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante, en un tampón de pH comprendido entre 7 y 8. El procedimiento permite extraer cuantitativamente el gluten contenido en una muestra de un alimento, tanto procesado por calor como no procesado por calor, como paso previo a la cuantificación por ELISA del gluten. De aplicación en el análisis de alimentos, en particular, de los alimentos destinados a los enfermos celíacos.

3/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

1

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS,  
PROCESADOS Y NO PROCESADOS POR CALOR, COMPATIBLE CON ELISA,  
COMPOSICIÓN Y KITS QUE COMPRENDEN DICHA COMPOSICIÓN

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona, en general, con el análisis de alimentos para enfermos celiacos, y, en particular, se refiere a un procedimiento para la extracción de gluten en alimentos, compatible con un ensayo de inmunoabsorción con  
10 enzimas ligadas (ELISA), a composiciones adecuadas para la puesta en práctica de dicho procedimiento, a kits que comprenden dichas composiciones y a un método para la cuantificación por ELISA del gluten presente en un alimento.

## 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La Enfermedad Celiaca (EC) es una enfermedad caracterizada por una intolerancia a las prolaminas del gluten de trigo, cebada, centeno y avena, que provoca cambios en el intestino que conllevan a una malabsorción.

20 El gluten comprende una mezcla compleja de proteínas y, mientras no se conozca el componente o componentes tóxicos del gluten causantes de la EC, la solución provisional consiste en la eliminación de todos los componentes del gluten en la dieta de estos enfermos. De hecho, el único  
25 tratamiento realmente eficaz para los pacientes celiacos consiste en seguir una dieta estrictamente libre de gluten. Por este motivo, resulta esencial la cuantificación precisa del contenido en gluten de los alimentos destinados a ser ingeridos por los enfermos celiacos.

30 Sin embargo, la medida fiable del contenido en gluten de los alimentos ha sido una de las asignaturas pendientes en los últimos años. Actualmente el gluten se determina por métodos epitopo-dependientes, tipo ELISA, que emplean anticuerpos monoclonales o policlonales. Un ELISA útil para

4/28

WO 02/091633

PCT/ES02/00208

2

cuantificar el gluten contenido en alimentos lo describen L. Sorell et al., en el artículo titulado *AAn innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis*", publicado en FEBS letters, 439, 46-50

5 (1988).

El protocolo rutinario de análisis de gluten en alimentos para celíacos, tanto procesados por calor como no procesados por calor, consiste en una extracción del gluten con una solución acuosa de etanol al 60% (60% etanol/agua) seguido de su cuantificación por ELISA.

Uno de los grandes problemas relacionados con la analítica del gluten en alimentos radica en que una gran parte de los alimentos para celíacos son procesados durante su elaboración a elevadas temperaturas (150-220°C). Debido a este tratamiento térmico, la mayoría de las fracciones tóxicas del gluten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -gliadinas) se desnaturalizan y se hacen insolubles por lo que no pueden ser extraídas con 60% etanol/agua. Como consecuencia de ello, el contenido en gluten de estos alimentos procesados por calor, independientemente del ELISA utilizado, no resulta fiable.

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se enfrenta con el problema de desarrollar un procedimiento para la extracción cuantitativa del gluten contenido en alimentos, compatible con los ELISA actualmente existentes para la cuantificación de gluten en alimentos.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que el empleo de una composición que comprende un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante en un tampón de pH comprendido entre 7 y 8, antes de extraer el gluten con una solución acuosa de etanol al 60%, solubiliza las fracciones tóxicas del gluten, lo que permite analizar cuantitativamente el gluten contenido en alimentos.

5/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

## 3

El rendimiento de extracción de gluten en alimentos alcanzado mediante el procedimiento desarrollado por esta invención es muy superior al obtenido mediante el sistema convencional de extracción de gluten basado únicamente en el empleo de 60% etanol/agua, tal como se muestra en las Tablas 1 y 2 (véanse los Ejemplos 1 y 3). Asimismo, la recuperación de gluten tanto en alimentos procesados por calor como en alimentos no procesados por calor es prácticamente cuantitativa, tal como se pone de manifiesto en la Figura 1 (véase el Ejemplo 2).

Un objeto de esta invención lo constituye un procedimiento para la extracción de gluten en alimentos, compatible con ELISA, que comprende efectuar la extracción del gluten con una solución acuosa de etanol en presencia de una composición que contiene un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante en un tampón con un pH comprendido entre 7 y 8.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye dicha composición útil para la puesta en práctica de dicho procedimiento de extracción de gluten en alimentos.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para la cuantificación por ELISA del gluten presente en una muestra de un alimento que comprende la extracción previa del gluten contenido en dicha muestra mediante el procedimiento de extracción de gluten previamente mencionado.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un kit que comprende dicha composición útil para la puesta en práctica de dicho procedimiento de extracción de gluten en alimentos, o sus componentes por separado. Dicho kit puede ser utilizado para extraer el gluten contenido en un alimento como paso previo a la cuantificación por ELISA del gluten contenido en un alimento.

6/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

4

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un diagrama de barras que representa el porcentaje de recuperación de gluten tanto en panes procesados a distintas temperaturas como en la harina con la que se han fabricado dichos panes, extraído mediante el procedimiento de extracción de gluten proporcionado por esta invención [INVENCIÓN] o mediante un método de referencia [60% ETANOL] (véase el Ejemplo 2).

## 10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona una composición, en adelante composición de la invención, que comprende un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante, en un tampón de pH comprendido entre 7 y 8.

15 El agente reductor de grupos disulfuro puede ser cualquier compuesto capaz de reducir grupos disulfuro, por ejemplo, 2-mercaptoetanol (2-ME), ditiotreitól, etc., y sus mezclas. La concentración del agente reductor de grupos disulfuro en la composición de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo, entre otras cosas, del agente reductor de grupos disulfuro en cuestión.

El agente disociante puede ser cualquier compuesto con la capacidad de abrir la conformación de las proteínas haciendo más accesible determinadas zonas de la cadena polipeptídica a reactivos externos y anticuerpos, por ejemplo, hidrocloreuro de guanidina, urea, etc., y sus mezclas. La concentración del agente disociante en la composición de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo, entre otras cosas, del agente disociante en cuestión. En una realización particular, el agente disociante es hidrocloreuro de guanidina, y la concentración de dicho compuesto en la composición de la invención está comprendida entre 1 y 6 M. Análogamente, en otra realización particular, el agente disociante es urea y la concentración de dicho compuesto en la composición de la

7/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

5

invención está comprendida entre 1 y 5 M.

El tampón puede ser cualquier disolución reguladora del pH de una disolución que tampona a un valor de pH comprendido entre 7 y 8, por ejemplo, solución salina con fosfatos (PBS) con un pH comprendido entre 7 y 8, Tris con un pH comprendido entre 7 y 8, etc.

En una realización particular de la composición de la invención, el agente reductor de grupos disulfuro es el 2-ME, el agente disociante es el hidrocloreuro de guanidina, y el tampón es PBS con un pH comprendido entre 7 y 8.

La composición de la invención es útil como "cóctel" de extracción de gluten en alimentos, tanto procesados por calor como no procesados por calor. Ha resultado sorprendente comprobar que el empleo de la composición de la invención en la extracción de gluten (que contiene un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante en un tampón con un pH determinado) no afecta adversamente a la cuantificación por ELISA del gluten contenido en un alimento.

La invención también proporciona un procedimiento para la extracción de gluten en una muestra de un alimento, en adelante procedimiento de la invención, que comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra con una solución acuosa de etanol en presencia de la composición de la invención.

De forma más concreta, el procedimiento de la invención, que comprende extraer el gluten con una solución acuosa de etanol y separar el sobrenadante que contiene el gluten extraído, se caracteriza porque antes de la extracción con dicha solución acuosa de etanol, la muestra a ensayar se mezcla con la composición de la invención, se incuba a una temperatura comprendida entre 37°C y 50°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 60 minutos, y se enfría hasta temperatura ambiente.

La concentración de etanol en la solución acuosa de etanol puede variar dentro de un amplio intervalo. En una realización particular, dicha solución acuosa de etanol tiene

9/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

6

un contenido en etanol comprendido entre el 50% y el 70%.

La muestra de alimento a ensayar se prepara por los métodos convencionales, que incluyen, en su caso, la molienda de la muestra, y se deposita en un recipiente apropiado, por ejemplo, un tubo de propileno. A continuación, se añade la composición de la invención, se cierra el recipiente y la mezcla resultante se agita. Ventajosamente, el recipiente que contiene dicha mezcla se sella, por ejemplo, con papel parafilm, con el fin de evitar la evaporación de dicha mezcla por acción del calor. En una realización particular, la incubación de la muestra con la composición de la invención se efectúa a una temperatura de 50°C durante 40 minutos. Finalizada la incubación, la mezcla resultante se deja enfriar hasta temperatura ambiente (entre 15°C y 25°C). A continuación, se añade una solución acuosa de etanol, tal como una solución acuosa de etanol al 60%, a dicha mezcla y se incuba a una temperatura y durante un periodo de tiempo apropiado, por ejemplo, a temperatura ambiente durante 1 hora, con agitación. Posteriormente, la mezcla de reacción se centrifuga, se retira el sobrenadante (que contiene el gluten extraído) y, finalmente, se cuantifica el contenido en gluten mediante un ELISA del tipo habitualmente utilizado en la cuantificación de gluten en alimentos.

Mediante el procedimiento de la invención se solubiliza prácticamente la totalidad de las fracciones tóxicas del gluten contenido en alimentos, tanto procesados por calor como no procesados por calor. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree que la composición de la invención actúa abriendo la conformación de las proteínas constituyentes del gluten, en particular, de la fracción tóxica del mismo, y, como consecuencia de ello, se favorece su solubilidad en el medio de extracción. Efectivamente, durante el procesamiento térmico de los alimentos, las fracciones del gluten (las  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -gliadinas) se desnaturalizan, se rompen los puentes disulfuro y,

9/28



WO 02/092633

PCT/ES02/00208

7

consecuentemente, se forman agregados insolubles que no pueden ser extraídos con 60% etanol/agua. El efecto combinado de los componentes de la composición de la invención hace que (i) el agregado insoluble pueda ser extraído con una solución acuosa de etanol (50-70% etanol/agua) y cuantificado por ELISA y (ii) que aumente la conformación de las moléculas de gluten quedando los determinantes antigénicos más expuestos a los anticuerpos, lo que provoca un aumento en la señal de ELISA.

10 No se conocen procedimientos de extracción cuantitativa de gluten en alimentos compatibles con los ELISA disponibles para su cuantificación. Ha resultado sorprendente comprobar que el empleo de un agente reductor de puentes disulfuro, tal como 2-ME, en combinación con un agente disociante, tal como 15 hidrocioruro de guanidina, permite extraer cuantitativamente (véase el Ejemplo 2) el gluten contenido tanto en alimentos procesados por calor como en alimentos no tratados con calor, sin afectar adversamente a su cuantificación por ELISA. Los resultados mostrados en la Figura 1 (Ejemplo 2) indican 20 claramente que el procedimiento de la invención constituye una herramienta muy apropiada previa a la cuantificación por ELISA del gluten en alimentos para celíacos procesados y no procesados por calor.

El procedimiento de la invención, parece constituir, por 25 tanto, un procedimiento general de extracción de gluten de alimentos, especialmente destinados a los enfermos celíacos, tanto procesados por calor como no procesados por calor, que solubiliza las fracciones tóxicas del gluten permitiendo analizar cuantitativamente el gluten en este tipo de 30 alimentos.

La invención también proporciona un método para la cuantificación por ELISA del gluten presente en una muestra de un alimento que comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra mediante el procedimiento de la invención y, a 35 continuación, cuantificar por ELISA el gluten previamente

10/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

8

extraído.

La invención también proporciona un kit que comprende la composición de la invención, o los componentes de dicha composición parcialmente mezclados o separados. Este kit puede ser utilizado para extraer el gluten contenido en una muestra de un alimento, tanto procesado por calor como no procesado por calor, o bien, para extraer el gluten como paso previo a su cuantificación por ELISA con el fin de determinar el contenido en gluten de la muestra de alimento ensayada. El kit puede contener, además, el resto de reactivos necesarios para la extracción del gluten, es decir, la solución acuosa de etanol o bien sus componentes por separado, y/o los reactivos necesarios para la realización de un ELISA para cuantificar el gluten contenido en un alimento, mezclados total o parcialmente entre sí o separados.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

20

#### EJEMPLO 1

Recuperación de gluten en alimentos procesados con calor

Se realizó este ensayo para comparar la eficacia del procedimiento proporcionado por esta invención en la extracción de gluten en alimentos procesados por calor, a diferentes temperaturas, frente a la del método utilizado habitualmente (Método de referencia).

##### 1.1 Materiales

Para la realización de este ejemplo se utilizaron los siguientes alimentos:

- A) Alimentos sometidos a temperaturas elevadas durante el proceso de elaboración (180-220°C):
- A.1) "sin gluten" pero contaminados de gluten (es decir, alimentos donde se declara que no contienen gluten

11/28

WO 02/092633

PCI/ES02/00208

9

pero que, en realidad si contienen gluten);

A.2) alimentos que contienen gluten; y

A.3) alimentos "sin gluten" no contaminados de gluten  
(es decir, alimentos que no contienen gluten y se  
utilizan como controles).

B) Alimentos sometidos a temperaturas intermedias (110°C  
aproximadamente): almidones contaminados con gluten.

#### 1.2 Método de referencia

El método de referencia es el método utilizado  
actualmente en la extracción de gluten utilizando una  
solución acuosa de etanol al 60%.

Para la realización de este método se pesan 0,125 g de  
la muestra de alimento molida y se depositan en un tubo de  
propileno de 10 ml. A continuación, se añaden 5 ml de  
solución 60% etanol y la mezcla de reacción se incuba durante  
1 hora, a temperatura ambiente, en un agitador rotatorio  
(Modelo LABINCO BV (posición 2-3)). Finalizada la incubación,  
las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 3.500 rpm  
(2.500 g), a temperatura ambiente (Centrífuga 5810  
Eppendorf), y el sobrenadante se pasa a unos tubos de  
propileno limpios de 10 ml y, a continuación, se analizan  
mediante un ELISA basado en un único anticuerpo monoclonal  
R5, utilizado como captura conjugado a peroxidasa de rábano  
picante (este ELISA es similar al descrito por L. Sorell et  
al., FEBS Letters, 439, 46-50 (1988) excepto que, en este  
caso, el sandwich del ELISA está basado en un único  
anticuerpo monoclonal R5, utilizado como captura y conjugado  
a peroxidasa de rábano picante; este ELISA permite  
cuantificar el gluten de trigo, cebada y centeno con una  
sensibilidad de detección de 1,5 ppm].

La solución acuosa de etanol al 60% se prepara  
mezclando, por ejemplo en una probeta, 300 ml de etanol  
(Scharlau Nv 121) y 200 ml de agua milli-Q (resistividad 18

12/28

WQ 02/092633

PCT/ES02/00208

10

MΩcm) y se guarda en frasco de vidrio.

### 1.3 Procedimiento de la invención

El procedimiento de la invención consiste en efectuar la  
5 extracción de gluten utilizando una solución acuosa de etanol  
al 60% en presencia de un agente reductor y de un agente  
disociante y en presencia de un tampón de pH 7-8.

Para la realización de este procedimiento se pesan 0,125  
g de la muestra de alimento molida y se depositan en un tubo  
10 de propileno de 10 ml. A continuación, se añaden 1,25 ml de  
una composición (cóctel de extracción) constituida por 2-ME  
250 mM, hidrocloreuro de guanidina 2 M y 0,1x PBS. Los tubos  
se cierran con el tapón de rosca/presión y se sellan con  
papel parafilm para evitar la evaporación por el calor. La  
15 mezcla de reacción se mezcla en un vortex y se incuba en una  
estufa a 50°C durante 40 minutos. Finalizada la incubación,  
la mezcla de reacción se deja enfriar hasta temperatura  
ambiente, y se añaden 3,75 ml de una solución acuosa al 80%  
de etanol a la mezcla de reacción y se incuba durante 1 hora  
20 a temperatura ambiente en un agitador rotatorio (Modelo  
LABINCO BV (posición 2-3)). Posteriormente, las muestras se  
centrifugan durante 10 minutos a 3.500 rpm (2.500 g) a  
temperatura ambiente (Centrífuga 5810 Eppendorf) y el  
sobrenadante se pasa a tubos de propileno limpios de 10 ml de  
25 propileno y, a continuación, se analizan por ELISA.

La solución acuosa de etanol al 80% se prepara  
mezclando, por ejemplo en una probeta, 400 ml de etanol  
(Scharlau Nv 121) y 100 ml de agua milli-Q (resistividad 18  
MΩcm) y se guarda en frasco de vidrio.

30 La composición o cóctel de extracción, constituida por  
2-ME 250 mM, hidrocloreuro de guanidina 2 M y 0,1x PBS, se  
prepara, por ejemplo, pesando 3,8 g de hidrocloreuro de  
guanidina Mr 95,53 (Fluka 50940) y añadiendo 15-18 ml de una  
solución de PBS (0,1x). A continuación se añaden 349 µl de 2-  
35 ME 14,29 M (Sigma M-6250), se enrasa hasta 20 ml con solución

13/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

11

PBS (0,1x) y se mezcla hasta disolución total.

La solución de PBS 0,1x se puede preparar diluyendo 1:100 una solución de PBS 10x. Para ello, se añade 1 ml de PBS 10x en una probeta y se enrasa hasta 100 ml con agua milli-Q (resistividad 18 MΩcm). La solución resultante debe tener un pH comprendido entre 7 y 8. La solución de PBS 10x se puede preparar mezclando y disolviendo 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 900-950 ml de agua destilada, en un vaso de precipitado de 1 l con agitación magnética y enrasando la solución resultante con agua destilada hasta 1.000 ml en un matraz aforado. La solución obtenida se almacena a temperatura ambiente.

#### 1.4 Resultados

La Tabla 1 muestra los valores de ELISA de 23 muestras de alimentos ("sin gluten" pero contaminados de gluten, alimentos que contienen gluten, y almidones contaminados con gluten) que han sido tratados a temperaturas elevadas, y 3 controles de alimentos "sin gluten" no contaminados de gluten.

En dicha Tabla 1 puede apreciarse claramente, en las 23 muestras ensayadas, un aumento en el porcentaje de gluten extraído con el procedimiento de la invención. El incremento del valor oscila entre aproximadamente un 30% y aproximadamente un 173% en la mayoría de los alimentos excepto en los 3 controles. El porcentaje medio del incremento del valor del gluten en estos alimentos es de un 70,4%.

14/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

12

Tabla 1

Análisis de gluten en alimentos procesados con calor  
extraídos con 60% etanol y con el cóctel de extracción

5		Muestra	60% Etanol	Cóctel de Extracción	% Aumento
		4064	1,5	4,1	173,3
		4062	9,2	9,5	3,3
10	"Sin gluten"	4011	3,9	6,2	59,0
	contaminadas	1143	4,1	10,3	151,2
		3177	3,9	7,9	102,6
		3181	4,1	9,2	124,4
15	220°C	3569	13,9	25,5	83,5
		3576	8,4	21,3	153,6
	"gluten"	3577	15,4	20,7	34,4
		3578	3,1	4,2	35,5
		3579	7,6	7,9	3,9
20		3619	8,6	11,2	30,2
		3624	14,5	18,8	29,7
		3683	3,6	7,9	119,4
		3817	7,8	14,0	79,5
25		2162	4,0	6,9	72,5
	110°C "Almidones"	4146	2,0	3,7	85,0
	"gluten"	2159	6,5	9,4	44,6
		2160	5,0	6,9	38,0
		2161	3,0	4,1	36,7
30		3592	8,2	14,2	73,2
		2195	6,3	10,2	61,9
		2163	4,3	5,8	34,9
		3515	<0,15	<0,15	0,0
35	220°C "Sin gluten"	3428	<0,15	<0,15	0,0
		3511	<0,15	<0,15	0,0
					70,4

15/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

13

## EJEMPLO 2

Recuperación cuantitativa de gluten  
en alimentos procesados con calor

Este ensayo pone de manifiesto la recuperación  
5 cuantitativa de gluten, obtenida mediante el procedimiento  
proporcionado por esta invención, en alimentos procesados con  
calor, a diferentes temperaturas, frente a la recuperación no  
cuantitativa de gluten obtenida utilizando el método de  
extracción habitual con etanol 60% (Método de referencia).

10

2.1 Materiales

Para la realización de este ejemplo se utilizaron:

- 15 1) panes elaborados a temperaturas diferentes: 20°C,  
60°C, 70°C, 90°C, 115°C, 150°C y 220°C; y
- 2) la harina con la que se elaboraron dichos panes.

2.2 Método de referencia

20 El método de referencia es el método utilizado  
actualmente en la extracción de gluten utilizando una  
solución acuosa de etanol al 60% [véase el Ejemplo 1.2].

2.3 Procedimiento de la invención

25 El procedimiento de la invención consiste en efectuar la  
extracción de gluten utilizando una solución acuosa de etanol  
al 60% en presencia de un agente reductor y de un agente  
disociante y en presencia de un tampón de pH 7-8 [véase el  
Ejemplo 1.3].

30

2.4 Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1, que  
representa el porcentaje de la recuperación de gluten en  
panes procesados a distintas temperaturas y en la harina con

14/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

14

la que se han fabricado dichos panes, y extraído mediante el método de referencia o mediante el procedimiento de la invención. En el eje de abscisas se representan las temperaturas del procesamiento del pan y en ordenadas se representa el porcentaje de recuperación de gluten, considerando el porcentaje recuperado en la harina utilizada para fabricar dichos panes como el 100%. En dicha Figura 1 se pone de manifiesto claramente la recuperación cuantitativa de gluten en los panes procesados a diferentes temperaturas (prácticamente del 100% a cualquier temperatura de procesamiento del pan) mediante el empleo del procedimiento de la invención frente a la recuperación no cuantitativa obtenida utilizando el método de referencia (60% etanol), observándose en este caso una reducción continua y progresiva del gluten recuperado (la recuperación de gluten disminuye proporcionalmente a medida que aumenta la temperatura de procesamiento del pan).

### EJEMPLO 3

Recuperación de gluten en alimentos no tratados con calor

Se realizó este ensayo para comparar la eficacia del procedimiento proporcionado por esta invención en la extracción de gluten en alimentos no tratados con calor, frente a la del método utilizado habitualmente (Método de referencia).

#### 3.1 Materiales

Para la realización de este ejemplo se utilizaron 7 muestras de harina de trigo (Tr) y 1 de centeno (Cn) sin tratar con calor (véase la Tabla 2).

#### 3.2 Método de referencia

El método de referencia es el método utilizado actualmente en la extracción de gluten utilizando una solución acuosa de etanol al 60% [véase el Ejemplo 1.2].

17/28



WO 02/092633

PCT/ES02/00208

15

### 3.3 Procedimiento de la invención

El procedimiento de la invención consiste en efectuar la extracción de gluten utilizando una solución acuosa de etanol al 60% en presencia de un agente reductor y de un agente disociante y en presencia de un tampón de pH 7-8 [véase el Ejemplo 1.3].

### 3.4 Resultados

La Tabla 2 muestra los valores de ELISA de 8 muestras de alimentos no tratados con calor. En dicha Tabla 2 puede apreciarse claramente, en las 8 muestras ensayadas, un aumento en el porcentaje de gluten extraído con el procedimiento de la invención. El incremento del valor oscila entre aproximadamente un 12% y aproximadamente un 47% en todos los alimentos incluidos los controles. El porcentaje medio del incremento del valor del gluten en estos alimentos es de un 27,3%.

20

Tabla 2

Análisis de gluten en alimentos no tratados con calor extraídos con 60% etanol y con el cóctel de extracción

25	Muestra	60% Etanol	Cóctel de Extracción	% Aumento
	Tr I	5,6	8,2	46,4
	Tr II	3,2	3,6	12,5
	Tr III	5,6	8,1	44,6
30	Tr IV	5,2	6,1	17,3
	Tr V	4,3	5,1	18,6
	Tr VI	8,1	9,5	17,3
	Tr VII	1,4	1,8	28,6
	Cn I	7,3	9,7	32,9
35				27,3

18/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

16

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante, en un tampón de pH  
5 comprendido entre 7 y 8.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho agente reductor de grupos disulfuro se selecciona entre 2-mercaptoetanol, ditiotreitól y sus mezclas.

10

3. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho agente disociante se selecciona entre hidrocloruro de guanidina, urea y sus mezclas.

15

4. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho tampón es una solución salina con fosfatos (PBS) con un pH comprendido entre 7 y 8 o Tris pH entre 7 y 8.

5. Un procedimiento para la extracción de gluten en una  
20 muestra de un alimento que comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra con una solución acuosa de etanol en presencia de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

25

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha solución acuosa de etanol tiene un contenido en etanol comprendido entre 50% y 70%.

19/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

17

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, que comprende mezclar la muestra a ensayar con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, incubar la mezcla resultante a una temperatura comprendida entre 37°C y 50°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 60 minutos, enfriar hasta temperatura ambiente, añadir una solución acuosa de etanol y separar el sobrenadante que contiene el gluten extraído.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la incubación de la muestra con dicha composición se efectúa a una temperatura de 50°C durante 40 minutos.
9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha solución acuosa de etanol es una solución acuosa de etanol al 60%.
10. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende, además, incubar la mezcla que contiene la muestra a ensayar, la composición de las reivindicaciones 1 a 4 y la solución acuosa de etanol.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la incubación de la mezcla que contiene la muestra a ensayar, la composición de las reivindicaciones 1 a 4 y la solución acuosa de etanol, se efectúa a temperatura ambiente durante 1 hora.
12. Un método para la cuantificación por ELISA del gluten presente en una muestra de un alimento que comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, y, a continuación, cuantificar por ELISA el gluten extraído.

35

20/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

18

13. Un kit que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o los componentes de dicha composición parcialmente mezclados o separados.

5 14. Kit según la reivindicación 13, que comprende, además, una solución acuosa de etanol o los componentes de dicha solución acuosa de etanol por separado.

10 15. Kit según la reivindicación 13, que comprende, además, los reactivos necesarios para la realización de un ELISA para cuantificar el gluten contenido en un alimento, mezclados total o parcialmente entre sí o separados.

21/28

WO 02/092633

1/1

PCT/ES02/00208

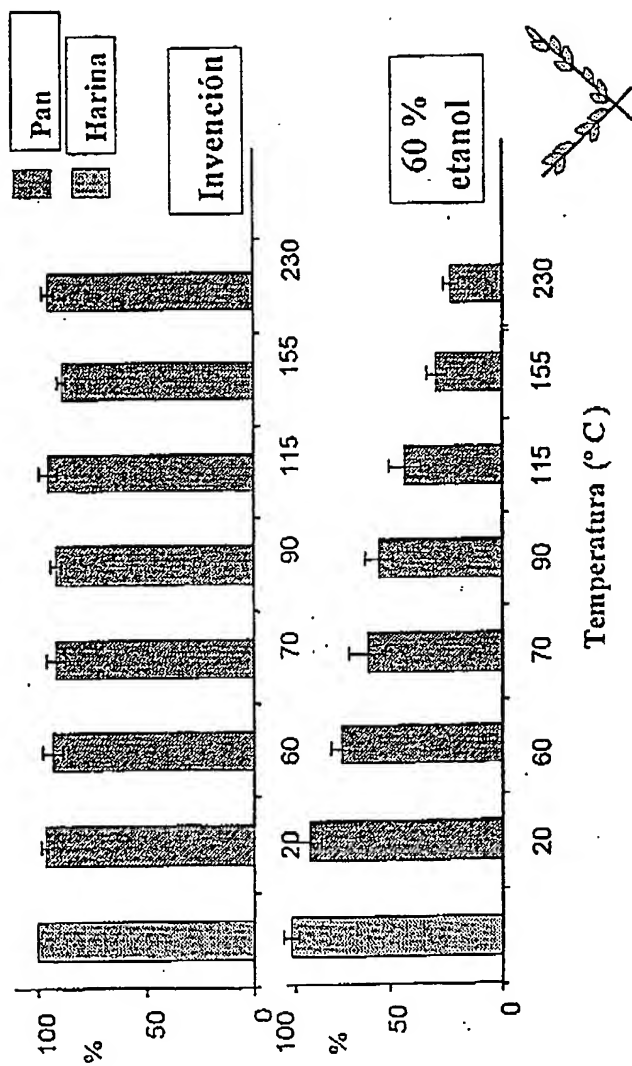


Figura 1

22/28

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES02/00208

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07K 16/16 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPÔQUE, STN, CIBEPAT		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 2207921 A (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 15.02.1989 The whole document	1-15
A	PETER J. FRAZIER et al. Lipid-protein Interaction During Dough Development. J. Sci. Food Agric. 1981. Vol.32 pag.877-897.	1-15
A	ARIS GRAVELAND et al. Extraction and Fraction of Wheat Flour Proteins. J. Sc. Food Agric. 1982. Vol.33 pag.1117-1128.	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 September 2002 (24.09.2002)		Date of mailing of the international search report 26 September 2002 (26.09.2002)
Name and mailing address of the ISA/		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

23/28

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family membersInternational Application No  
PCT/ES02/00208

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB2207921	15.02.1989	AU1891788	12.01.1989
		AU611921	27.06.1991
		CA1294903	28.01.1992

## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ES02/00208

<b>A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD</b> CIP <sup>7</sup> C07K 16/16 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.		
<b>B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA</b> Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación) CIP <sup>7</sup> C07K Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPOQUE, STN, CIBEPAT		
<b>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES</b>		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	GB 2207921 A (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 15.02.1989 todo el documento	1-15
A	PETER J. FRAZIER et al Lipid-protein Interaction During Dough Development. J. Sci. Food Agric. 1981. Vol.32 pag.877-897.	1-15
A	ARIS GRAVELAND et al. Extraction and Fraction of Wheat Flour Proteins. J. Sc. Food Agric. 1982. Vol.33 pag.1117-1128.	1-15
<input type="checkbox"/> En la continuación del resumen C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que pueda plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicación). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "Z" documento que forma parte de la misma familia de patentes.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 24/09/2002	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 26 SEP 2002 26.09.02	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá, 1, 28071-Madrid, España. n° de fax +34 91 3495304	Funcionario autorizado Mar Ybarra Fernandez n° de teléfono + 34 91 34 95536	

26/20



## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 02/00208

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
GB2207921	15.02.1989	AU1891788	12.01.1989
		AU611921	27.06.1991
		CA1294903	28.01.1992

26/28

Copy for the designated Office (DO/EP)

PCT/ES02/00208

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and  
Administrative Instructions, Sections 402 and 409)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

REPRESA SÁNCHEZ, Domingo  
Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas  
Oficina de Transferencia de  
Tecnología  
C/Serrano, 113 - 2ª planta  
E-28006 Madrid  
Spain

Date of mailing (day/month/year) 10 September 2002 (10.09.02)	
Applicant's or agent's file reference 200101098	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/ES02/00208	International filing date (day/month/year) 03 May 2002 (03.05.02)
Applicant CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS et al	

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application.

1. ☒ Correction of priority claim. In accordance with the applicant's notice received on: 11 July 2002 (11.07.02), the following priority claim has been corrected to read as follows:

ES 14 May 2001 (14.05.01) P 200101098

- ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.  
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:

EPO - DG 1

2. ☐ Addition of priority claim. In accordance with the applicant's notice received on: , the following priority claim has been added:

23.09.2002

- ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.  
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:

(104)

3. ☐ As a result of the correction and/or addition of (s) priority claim(s) under items 1 and/or 2, the (earliest) priority date is:

4. ☐ Priority claim considered not to have been made.

- ☐ The applicant failed to respond to the invitation under Rule 26bis.2(a) (Form PCT/IB/316) within the prescribed time limit.  
☐ The applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(e).  
☐ The applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.

The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(c) and the PCT Applicant's Guide, Volume I, Annex B2(II).

6. ☐ In case where multiple priorities have been claimed, the above item(s) relate to the following priority claim(s):

6. A copy of this notification has been sent to the receiving Office and

- ☒ to the International Searching Authority (where the international search report has not yet been issued).  
☒ the designated Offices (which have already been notified of the receipt of the record copy).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Lazar Joseph PANAKAL
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/318 (July 1998)

005095404

27  
/28

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**